

## 蛋白激酶 C 抑制剂对吸烟大鼠脑血管内皮细胞细胞间粘附分子 1 表达的影响

万功山, 柳忠兰, 曲 芸, 宋 红, 白丽虹, 曲永瑜  
(中国医科大学附属第一医院神经内科, 辽宁省沈阳市 110011)

[关键词] 神经内科; 蛋白激酶 C 抑制剂; 细胞间粘附分子 1; 脑梗死; 吸烟

[摘要] 目的 探讨蛋白激酶 C 抑制剂对吸烟大鼠脑血管内皮细胞细胞间粘附分子 1 蛋白和 mRNA 表达的影响。方法 无脑梗死大鼠 18 只, 随机分为不吸烟组 6 只、吸烟组 6 只和吸烟蛋白激酶 C 抑制剂组 6 只。脑梗死大鼠 48 只, 随机分为脑梗死组 24 只和蛋白激酶 C 抑制剂组 24 只, 分别于梗死后 2、6、12 及 24 h 干预, 每个时间点 6 只。采用免疫组织化学法和原位杂交法分别测定细胞间粘附分子 1 蛋白和 mRNA。结果 吸烟大鼠脑血管内皮细胞细胞间粘附分子 1 蛋白和 mRNA 均有表达, 吸烟蛋白激酶 C 抑制剂组脑血管内皮细胞细胞间粘附分子 1 蛋白和 mRNA 的表达明显低于吸烟组 ( $P < 0.05$ )。蛋白激酶 C 抑制剂组细胞间粘附分子 1 蛋白和 mRNA 的表达均低于对应时间点脑梗死组 ( $P < 0.05$ ), 且梗死后 2 h 蛋白激酶 C 抑制剂组细胞间粘附分子 1 蛋白和 mRNA 的表达明显低于其他时间点组。结论 蛋白激酶 C 抑制剂可阻断吸烟大鼠脑血管内皮细胞细胞间粘附分子 1 蛋白和 mRNA 表达, 并且早期用药效果可能更好。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

### Effects of Protein Kinase C Inhibitor on the Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 Protein and mRNA on Cerebrovascularendothelial Cells in Smoking Rats

WAN Gong-Shan, LIU Zhong-Lan, QU Yun, SONG Hong, BAI Li-Hong, and QU Yong-Yu

(Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, ShenYang 110011, Liaoning, China)

[KEY WORDS] Protein Kinase C Inhibitor; Intercellular Adhesion Molecule-1; Cerebral Infarction; Smoking

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of protein kinase C inhibitor on expression of intercellular adhesion molecule-1 protein and mRNA in smoking rats. **Methods** The expression of intercellular adhesion molecule-1 protein and mRNA were observed by immunohistochemistry and in situ hybridization. 18 non-infarcted rats were randomly divided into three groups including 6 non-smoking rats, 6 no medicine treated smoking rats and 6 protein kinase C inhibitor treated smoking rats. 48 infarcted rats were randomly divided into two groups including 24 no medicine treated rats and 24 protein kinase C inhibitor treated rats. 2 hours, 6 hours, 12 hours or 24 hours after infarction the medicine were given, 6 rats in each time points. **Results** Compared with no medicine groups, the expression of intercellular adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 mRNA were decreased with corresponding identical time points in protein kinase C inhibitor groups, which showed statistical difference ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Protein kinase C inhibitor could reduce the expression of intercellular adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 mRNA in smoking rats cerebrovascularendothelial cells, the medicine were given more early, more effect will be produced.

吸烟是缺血性脑卒中的危险因素之一。研究表明吸烟可使细胞间粘附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 蛋白的表达升高, 并且升高程度与吸烟量呈正相关<sup>[1]</sup>。ICAM-1 蛋白主要由血管内皮细胞表达, 在缺血性脑卒中时介导血管内皮细胞与中性粒细胞的粘着, 中性粒细胞附壁, 游出,

发挥多种效应, 引起缺血性损伤。核因子  $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 是能够调整免疫及炎症基因表达的一个重要细胞信号转导分子, 对 ICAM-1 蛋白表达有调控作用。蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是核因子  $\kappa$ B 的一种上游激酶, 广泛参与细胞信号转导, 细胞分化, 基因激活等。PKC 通过参与  $\kappa$ B 抑制蛋白 (inhibitor of  $\kappa$ B, I $\kappa$ B) 的磷酸化, 使 I $\kappa$ B 与核因子  $\kappa$ B 的解离而使其激活。PKC 抑制剂则可阻断该途径。本研究通过观察 PKC 抑制剂灯盏花注射液对吸烟引起的 ICAM-1 表达的影响, 探讨 PKC 抑制剂对吸烟条件下脑梗死的干预作用及最佳治疗时间窗。

[收稿日期] 2007-03-15 [修回日期] 2007-11-01

[基金项目] 卫生部科学研究基金(98-1-196)资助; 辽宁省自然科学基金(9801500303)资助

[作者简介] 万功山, 硕士, 主治医师, E-mail 为 gaof137@sohu.com。曲芸, 硕士, 医师, 研究方向为缺血性脑卒中的发病机制及其治疗。通讯作者柳忠兰, 主任医师, 教授, 研究方向为缺血性脑卒中的发病机制及其治疗。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

ICAM-1(CD54) 免疫组织化学试剂盒及原位杂交试剂盒购自武汉博士德公司; 灯盏花注射液购自云南制药公司; 核甘酸酶抑制剂(diethyl pyrocarbonate, DEPC) 购于 Sigma 公司。

### 1.2 吸烟大鼠模型的制作

雄性 Wistar 大鼠, 体重 280~320 g, 由中国医科大学实验动物中心提供, 置于自制熏烟笼中<sup>[1]</sup>。市售某品牌香烟, 尼古丁含量每支 1.2 mg, 每日被动吸烟 5 支×4 次, 共 12 周。熏烟笼两侧多孔, 熏烟时一侧送入新鲜空气。

### 1.3 动物分组

66 只大鼠随机分为无脑梗死组 18 只和梗死组 48 只。无脑梗死组不给予线栓法致大脑中动脉梗死, 再随机分为不吸烟组 6 只、吸烟组 6 只和吸烟 PKC 抑制剂组 6 只, 给 PKC 抑制剂 4 h 后取脑。脑梗死组给予线栓法致大脑中动脉梗死, 再随机分为给 PKC 抑制剂组 24 只和脑梗死组 24 只, 分别于大脑中动脉梗死后 2、6、12 及 24 h 采用腹腔注射 PKC 抑制剂, 每个时间点 6 只大鼠, 给药后 4 h 取脑。

### 1.4 线栓法致大脑中动脉梗死模型的制作

所有大鼠吸烟至规定时间, 采用 Longa 线栓法制作大鼠一侧大脑中动脉闭塞<sup>[2]</sup>。10% 水合氯醛 3 mL/kg 腹腔麻醉, 暴露心脏, 心尖处插管, 剪开右心耳排液, 快速灌注 4℃生理盐水 200 mL, 然后 4℃、4%多聚甲醛(含核甘酸酶抑制剂) 固定液灌注 30 min, 快速断头取脑, 保留视交叉后 4 mm 处脑组织, 石蜡包埋, 连续冠状切片, 每张厚 5 μm。切片粘于多聚赖氨酸包被的载玻片上。

### 1.5 免疫组织化学法检测细胞间粘附分子 1 蛋白的表达

切片常规脱蜡至水, 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/甲醇室温灭活内源性酶。胰蛋白酶液消化处理, pH6.0、0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液热修复抗原。滴加正常山羊血清封闭液, 甩去多余液体, 不洗。滴加适当稀释的兔抗大鼠 ICAM-1 抗体, 4℃湿盒中过夜; 滴加生物素化山羊抗兔抗体(1:100); 滴加 SABC 试剂; DAB 液进行显色反应, 镜下控制, 流水终止。各步骤中间均 PBS 洗涤。苏木素复染核, 脱水, 透明, 封片。设置阴性对照组, 采用 PBS 代替一抗、二抗及 SABC。

### 1.6 原位杂交法检测细胞间粘附分子 1 mRNA 的表达

切片常规脱蜡至水, 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/甲醇灭活内源

性酶, 3% 柠檬酸稀释的胃蛋白酶室温 30 min, 1% 多聚甲醛(含 0.1% 核甘酸酶抑制剂) 室温固定 10 min; 地高辛标记探针检测试剂盒, 每张切片 20 μL 预杂交液, 置于底部装有 20% 甘油的湿盒中; 每张切片 20 μL 杂交液, 原位杂交专用盖玻片 38℃恒温箱中过夜, 揭去盖玻片; 滴加封闭液, 加生物素化鼠抗地高辛; 加 SABC、DAB 充分显色, 苏木素复染, 脱水, 封片。各步骤中间均用 PBS 或蒸馏水洗涤。设立阴性对照, 杂交液中不加地高辛标记的探针, 组织块预先用 RNase 处理。

### 1.7 图像分析及统计学处理

ICAM-1 蛋白和 mRNA 染色表现为胞质染成黄色或棕黄色, 胞质灰度值小表明 ICAM-1 蛋白和 mRNA 表达强, 反之则弱。采用 Morph/Coolsnapfx/Ax70 显微图像分析系统进行图像采集及灰度分析。每例动物检测 2 张切片, 每张切片选取 5 个不重叠视野, 计算每例动物皮质内脑血管内皮细胞胞质染色平均灰度值。采用 SPSS11.5 统计软件进行方差分析及 *t* 检验, 行单因素方差分析, 组间变量行两两比较的 SNK 法分析。

## 2 结果

### 2.1 无脑梗死大鼠血管内皮细胞细胞间粘附分子 1 蛋白和 mRNA 的表达

吸烟大鼠脑血管内皮细胞 ICAM-1 蛋白和 mRNA 均有表达。吸烟 PKC 抑制剂组脑血管内皮细胞 ICAM-1 蛋白和 mRNA 的表达明显低于吸烟组( $P < 0.05$ ; 表 1 和图 1)。

### 2.2 脑梗死大鼠血管内皮细胞细胞间粘附分子 1 蛋白和 mRNA 的表达

PKC 抑制剂组 ICAM-1 蛋白和 mRNA 的表达均低于对应时间点脑梗死组( $P < 0.05$ ), 且梗死后 2 h 蛋白激酶 C 抑制剂组 ICAM-1 蛋白和 mRNA 的表达明显低于其他时间点组( $P < 0.05$ ; 表 2 和图 2)。

表 1. 蛋白激酶 C 抑制剂对无脑梗死大鼠脑血管内皮细胞细胞间粘附分子 1 蛋白和 mRNA 表达的影响

分 组	mRNA	蛋白
不吸烟组	98.2±3.6	90.6±2.4
吸烟 PKC 抑制剂组	80.3±2.5 <sup>ab</sup>	67.7±4.0 <sup>ab</sup>
吸烟组	75.3±3.0 <sup>a</sup>	60.0±2.6 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与不吸烟组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与脑梗死组比较。

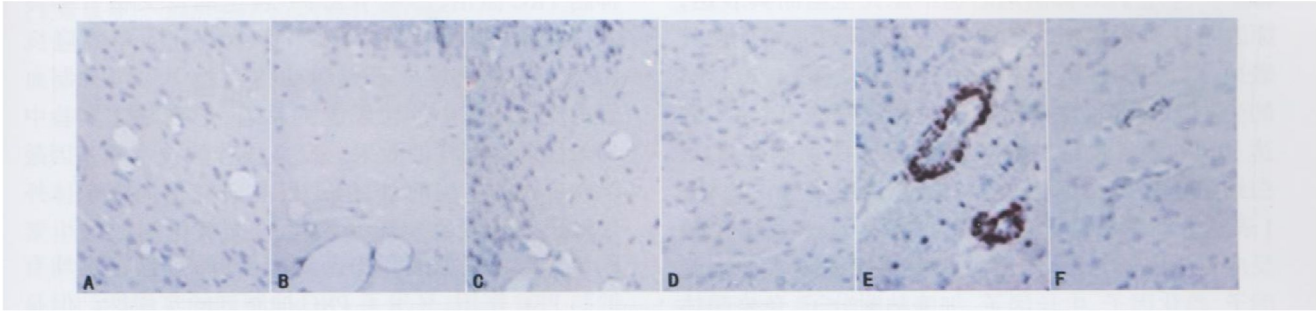


图 1. 无脑梗死大鼠血管内皮细胞细胞间粘附分子 1 蛋白和 mRNA 的表达 (×400) A 为不吸烟组 ICAM-1 mRNA 的表达, B 为吸烟组 ICAM-1 mRNA 的表达, C 为吸烟 PKC 抑制剂组 ICAM-1 mRNA 的表达, D 为不吸烟组 ICAM-1 蛋白的表达, E 为吸烟组 ICAM-1 蛋白的表达, F 为吸烟 PKC 抑制剂组 ICAM-1 蛋白的表达。

表 2. 蛋白激酶 C 抑制剂对脑梗死大鼠脑血管内皮细胞细胞间粘附分子、蛋白和 mRNA 表达的影响

分 组	mRNA				蛋白			
	2 h	6 h	12 h	24 h	2 h	6 h	12 h	24 h
PKC 抑制剂组	77.3 ± 3.7 <sup>ab</sup>	68.0 ± 3.1 <sup>a</sup>	60.3 ± 1.7 <sup>a</sup>	56.7 ± 2.9 <sup>a</sup>	65.4 ± 5.1	61.1 ± 3.4	54.0 ± 2.3	50.1 ± 2.0
脑梗死组	70.2 ± 4.1	66.1 ± 3.4	58.6 ± 1.2	54.3 ± 2.8	58.3 ± 2.6	54.8 ± 3.6	51.5 ± 3.9	48.8 ± 4.0

a 为  $P < 0.05$ , 与脑梗死组同一时间点比较; b 为  $P < 0.05$ , 与同组其它时间点比较。

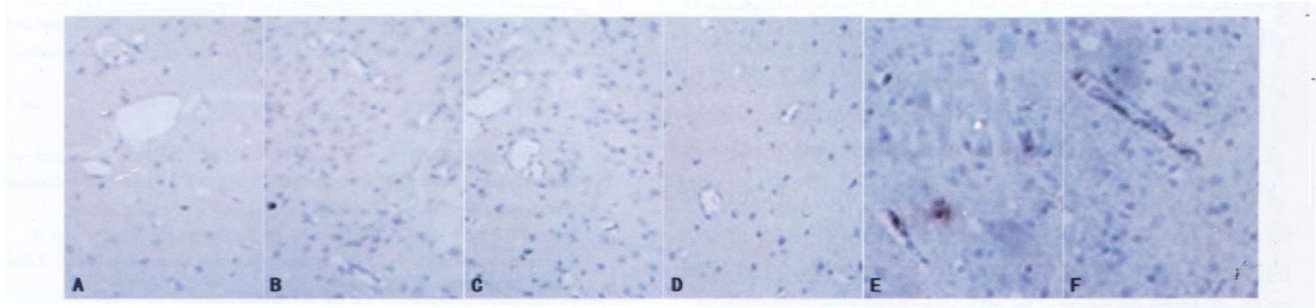


图 2. 脑梗死大鼠血管内皮细胞细胞粘附分子 1 mRNA 的表达 (×400) A 为脑梗死 2 h, B 为脑梗死 2 h PKC 抑制剂组, C 为脑梗死 6 h, D 为脑梗死 6 h PKC 抑制剂组, E 为脑梗死 12 h PKC 抑制剂组, F 为脑梗死 24 h PKC 抑制剂组。

3 讨论

吸烟能使血液粘滞度升高,红细胞比容显著升高。尼古丁能使神经末梢和肾上腺髓质释放肾上腺素和去甲肾上腺素,引起血管收缩,血流阻力增大,并导致血管壁损伤。肾上腺素可使血小板聚集,发生释放反应,易致血栓形成。最近的研究表明吸烟可使 ICAM-1 蛋白和 mRNA 升高,其中长期大量吸烟组 ICAM-1 表达最多,不同的吸烟量与时程和 ICAM-1 蛋白及 mRNA 表达呈正相关,戒烟组 ICAM-1 蛋白和 mRNA 表达与对照组相比无显著性差异<sup>[1]</sup>。本研究发现,无脑梗死组吸烟大鼠脑血管内皮细胞均表达 ICAM-1 蛋白和 mRNA,说明吸烟确实可以通过某种机制引起 ICAM-1 蛋白和 mRNA 表达升高。

细胞间粘附分子 1(ICAM-1)是免疫球蛋白超家

族的细胞粘附糖蛋白,作为一种配体介导白细胞的粘附及迁移,大量白细胞聚集造成微循环障碍。白细胞被活化后多种生物活性物质释放,引起并加重组织损伤。在正常情况下,血管内皮细胞,上皮细胞和淋巴细胞中的 ICAM-1 呈低水平表达。大鼠脑出血后 3 h 脑血管内皮细胞即有 ICAM-1 表达,24 h 表达明显,至 72 h 达高峰,持续至 7 天仍有表达<sup>[3]</sup>。大鼠短暂性大脑中动脉闭塞后 3 h ICAM-1 mRNA 表达明显增加,6~12 h 达高峰,并持续 3 天<sup>[4]</sup>。大鼠永久性大脑中动脉闭塞缺血侧皮质 ICAM-1 mRNA 在缺血后 3 h 显著增加,6~12 h 达高峰,并持续 5 天<sup>[5]</sup>。本研究中吸烟条件下大鼠大脑中动脉闭塞 24 h 内可见 ICAM-1 蛋白和 mRNA 的表达,较未阻塞吸烟鼠明显升高,其表达与脑梗塞时间呈正相关,说明 ICAM-1 蛋白和 mRNA 确实有表达延迟和持久的

特点。应用 PKC 抑制剂后也不能完全阻断其表达,原因是缺血性损伤时各种炎症介质反过来可促使其表达,形成恶性循环;作为一种大分子蛋白, ICAM-1 的生物降解和移除必定有一过程。刺激 ICAM-1 表达上调的因素包括肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 1、白细胞介素 6、白细胞介素 8、缺氧及吸烟等。ICAM-1 表达上调受核因子  $\kappa B$  调控。核因子  $\kappa B$  是一个快反应转录因子<sup>[6]</sup>,其作用主要是调控编码多种细胞因子、趋化因子、生长因子、细胞粘附分子、免疫受体及转录因子等,参与免疫、炎症和细胞凋亡等生理和病理过程中的基因表达调控<sup>[7]</sup>。

蛋白激酶 C(PKC)可激活核因子  $\kappa B$  启动转录,抑制 PKC 可阻止其激活<sup>[8]</sup>。PKC 通过参与 I $\kappa B$  的磷酸化,使 I $\kappa B$  与核因子  $\kappa B$  的解离而使其激活。PKC 抑制剂则阻止其激活。灯盏花注射液的有效成分是灯盏花素,是从菊科短茎飞蓬中提取的。灯盏花素是在黄芩素的 4 位接上一个羟基,对 PKC 有很强的抑制作用<sup>[9]</sup>,故本研究选用灯盏花注射液做为 PKC 抑制剂。本研究发现,PKC 抑制剂灯盏花素对吸烟大鼠脑血管内皮细胞 ICAM-1 蛋白和 mRNA 表达有抑制作用,提示 PKC 抑制剂阻断了吸烟大鼠 ICAM-1 蛋白和 mRNA 的表达,PKC 抑制剂的这种阻断作用可以看作是影响了蛋白激酶活性,继而阻断核因子  $\kappa B$  和 ICAM-1 的表达。而吸烟大鼠梗死组不同时间点给予 PKC 抑制剂后 ICAM-1 蛋白和 mRNA 的表达降低,也说明 PKC 抑制剂可阻断 ICAM-1 蛋白和 mRNA 的表达。梗死后 2 h ICAM-1 蛋白和 mRNA 的表达明显低于其他时间点,说明 PKC 抑制剂干预越早,ICAM-1 蛋白和 mRNA 的表达越弱,提示早期给予 PKC 抑制剂可以减缓吸烟大鼠 ICAM-1 表达增高的趋势,减少吸烟脑梗死的发生,并对吸烟脑梗死有较好的治疗作用。

吸烟可诱发大鼠缺血性卒中的发生,并可加重其损伤程度,使脑梗死面积增大<sup>[11]</sup>。本研究中无脑梗死吸烟大鼠给予 PKC 抑制剂即可抑制 ICAM-1 的表达,提示 PKC 抑制剂可能对吸烟大鼠发生缺血性卒中有预防作用。目前阻断 ICAM-1 的常用途径有应用 ICAM-1 单克隆抗体<sup>[10,11]</sup>,抑制核因子  $\kappa B$  激活,

抑制 PKC 激活,影响 ICAM-1 表达的反义核苷酸技术,ICAM-1 基因敲除<sup>[12]</sup>。尽管小鼠抗人单克隆抗 ICAM-1 抗体在体外研究和动物实验中均可抑制血管内皮细胞与中性粒细胞的粘着,但在临床实验中却未能取得同样的效果。反义核苷酸技术和基因敲除有广阔的应用前景,但是目前研究仍局限于体外细胞研究和动物实验。常见的抗氧化剂如维生素 E、N-乙酰半胱氨酸和中药如银杏叶、灯盏花素均有抑制 PKC 作用,显示了 PKC 抑制剂的实用性。但是高效性、专一性及危险性小的药物仍需研发。

#### [参考文献]

- [1] 柳忠兰,孙大勇. 吸烟鼠脑血管内皮细胞间粘附因子 1 的表达在动脉粥样硬化形成中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 4: 392-394.
- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [3] 梁志刚,刘兆孔,高晓兰,崔元孝,毕延萍. 脑出血大鼠血肿周围脑组织细胞间黏附分子的表达与脑水肿的关系[J]. 临床神经病学杂志, 2006, 19 (1): 67-69.
- [4] Venuganti R, Dempsey RJ, Bowen KK. Inhibition of intercellular adhesion molecule-1 protein expression by antisense oligonucleotides is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in rat [J]. *Stroke*, 2004, 35: 179-184.
- [5] Berti R, Williams AJ, Moffett JR, Hale SL, Velarde LC, Elliott PJ, et al. Quantitative real-time RT-PCR analysis of inflammatory gene expression associated with ischemia reperfusion brain injury [J]. *J Cerebral Blood Flow Metabolism*, 2002, 22: 1 068-079.
- [6] Perkins ND. Achieving transcriptional specificity with NF- $\kappa B$  [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29: 1 433-448.
- [7] Andreaskos ET, Foxwell BM, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. Cytokines and anti-cytokine biologicals in autoimmunity: present and future [J]. *Cytokine Growth factor Rev*, 2002, 13: 299-313.
- [8] Catley MC, Cambridge LM, Nasuhara Y, Ito K, Chivers JE, Beaton A, et al. Inhibitors of protein kinase C (PKC) prevent activated transcription [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 18 457-466.
- [9] 徐光,张礼萍,沈慧芳,胡昌奇. 野黄芩甙元极其类似物对蛋白激酶 C 的抑制作用[J]. 上海医科大学学报, 1993, 20 (6): 187-190.
- [10] Zhang RL, Chopp M, Jiang N, Tang WX, Probst J, Manning Am, et al. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the wistar rat [J]. *Stroke*, 1995, 26: 1 438-442.
- [11] Chopp M, Li Y, Jiang N, Zhang RL, Probst J. Antibodies against adhesion molecules reduce apoptosis after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain [J]. *J Cerebral Blood Flow Metabolism*, 1996, 16 (4): 578-584.
- [12] Connolly ES JR, Winfree CJ, Springer TA, Naka Y, Liao H, Yan SD, et al. Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion: role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke [J]. *J Clin Invest*, 1996, 97: 209-216.

(此文编辑 文玉珊)